

MeCP2変異ヒト歯髄細胞および MeCP2欠損マウス 迷走神経背側運動核ニューロンについての免疫組織化学的研究

星 まなみ

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野

日本大学歯学部小児歯科学講座

(指導: 白川哲夫 教授, 菊入 崇 准教授)

要旨

【目的】メチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) をコードする遺伝子 *MECP2* の変異は、重度の発達異常を呈するレット症候群 (RTT) を引き起こす。本研究では *MECP2* の 1 塩基変異により発症した RTT 女児の永久歯から幹細胞を分離し特性の解析を試みた。また、MeCP2欠損が延髄の機能にどのような影響を及ぼしているかを検討するために、*Mecp2*欠損 (*Mecp2*^{-/-}) マウスを用いて、迷走神経背側運動核 (DMV) におけるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) およびコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 免疫陽性 (IR) ニューロンの数と分布を調べた。

【方法】10代の RTT 女児および健常女児の抜去歯から歯髄組織を採取し実験に供した。歯髄細胞での未分化マーカーの発現について RT-PCR にて確認するとともに、MeCP2および幹細胞マーカーの発現と細胞内の局在を免疫蛍光染色で調べた。続いて、*Mecp2*^{-/-} および野生型 (Wt) マウスの DMV での TH-IR および ChAT-IR ニューロンの分布を DAB 染色あるいは免疫蛍光二重染色で検討した。

【結果】健常女児由来細胞 (CONT) では MeCP2が核内に局在していたのに対し、RTT 女児由来細胞 (RETT) では核とともに細胞質にも局在を認めた。Ki-67発現はともに核内に限局していたが、陽性率は CONT に比べ RETT で低かった。STRO-1, SSEA3の発現は両細胞で差異はなかった。DMV における TH-IR ニューロン数は Wt マウスに比べ *Mecp2*^{-/-} マウスで有意に多かったが、ChAT-IR ニューロン数には違いがなかった。また *Mecp2*^{-/-} マウスについて TH および ChAT が共発現するニューロンが多く観察された。

【結論】RETT では変異 *MECP2* の転写が活性化している細胞が一定の割合で含まれていると考えられ、Ki-67の陽性率が CONT より有意に低かったことから *MECP2* の変異が RETT の増殖能を低下させている可能性が考えられた。また DMV における TH-IR ニューロン数、ならびに TH と ChAT の共発現に *Mecp2*^{-/-} と Wt マウスで違いがみられたことから、MeCP2の欠損が DMV ニューロンの活動を変化させ、消化管運動を調節している副交感神経の働きに影響を及ぼしていることが示唆された。

キーワード:メチル化 CpG 結合タンパク質 2, レット症候群, 歯髄幹細胞, 迷走神経背側運動核

Immunohistochemical studies of MeCP2-mutated human dental pulp cells and the dorsal motor nucleus of the vagus neurons in *Mecp2*-deficient mice

Manami Hoshi

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Health Sciences

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry

(Directors : Prof. Tetsuo Shirakawa, Assoc. Prof. Takashi Kikuri)

Abstract

【Purpose】Mutations in *MECP2*, the gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), cause Rett syndrome (RTT) that presents severe developmental abnormalities. This study attempted to isolate and characterize dental pulp stem cells from a RTT girl affected with a single-nucleotide mutation in *MECP2*. In addition, to investigate how MeCP2 deficiency affects visceral motor functions, the expression of tyrosine hydroxylase (TH) and choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactive (IR) neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) was examined in *Mecp2*-deficient (*Mecp2*^{-/-}) mice.

【Methods】Pulp cells were obtained from extracted permanent teeth of a RTT girl and a healthy girl. The expression of undifferentiated cell markers was examined by RT-PCR, and the expression and localization of MeCP2 and stem cell markers were investigated by immunofluorescence staining. Subsequently, the number and

(受付: 令和5年1月30日)

責任著者連絡先: 星 まなみ

日本大学歯学部小児歯科学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8106

FAX: 03-3219-8353

E-mail: dema19026@gnihon-u.ac.jp

distribution of TH-IR and ChAT-IR neurons were examined in DMV of *Mecp2*^{-y} and wild-type (Wt) mice by DAB staining and immunofluorescence double staining.

[Results] In the pulp cells derived from the healthy girl (CONT), MeCP2 was localized in the nucleus. However, MeCP2 was localized in both nucleus and cytoplasm of the pulp cells derived from the RTT girl (RETT). Ki-67 was expressed in the nucleus in both CONT and RETT, but the positive rate of Ki-67 was significantly lower in RETT. No difference was seen in the expression of STRO-1 and SSEA3 between CONT and RETT. The number of TH-IR neurons in DMV was significantly larger in *Mecp2*^{-y} mice than that in Wt mice, while no difference was seen in the number of ChAT-IR neurons between *Mecp2*^{-y} and Wt mice. In addition, neurons co-expressing TH and ChAT were observed abundantly in *Mecp2*^{-y} mice but not in Wt mice.

[Conclusion] In RETT, mutated *MECP2* was transcriptionally activated at a certain rate, which might have lowered the positive rate of Ki-67 and reduced proliferation ability of the cells. The increase in the number of TH-IR neurons and co-expression of TH and ChAT in DMV of *Mecp2*^{-y} suggest that MeCP2 deficiency may alter neuronal activities in DMV and affect the parasympathetic control of visceral functions.

Keywords: methyl-CpG-binding protein 2, Rett syndrome, dental pulp stem cells, dorsal motor nucleus of the vagus

緒 言

X染色体上にあってメチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) をコードする遺伝子 *MECP2* の変異は、重度の発達異常を呈するレット症候群 (RTT) を引き起こすことが知られている^{1,2)}。RTT は約 1 万人に 1 人の割合で主に女兒に発症し、1 歳 6 か月以降で精神発達遅滞³⁾のほか様々な全身的症状が発現する。RTT の主要な診断基準として、合目的な手の機能の喪失、音声言語コミュニケーションの喪失、失調性歩行、手の常同運動が挙げられており⁴⁾、そのほか消化管運動異常や便秘⁵⁾、歯科領域では咀嚼機能の低下および歯列不正が高率で認められる⁴⁾。また著明なブラキシズムを示す場合もある⁴⁾。さらに MeCP2 の異常は RTT 以外の中枢神経系の疾患においても認められることがあり、MeCP2 の異常が複数の疾患の発症に重要な役割を果たしていることが示唆されている³⁾。

RTT 患者から試料を採取して実施する研究では、人を対象とする医学系研究に必要な倫理的要件を満たすことが必須であり、また試料採取に伴う被験者への侵襲を最小限に留める必要がある。歯科領域において日常的な医療行為として抜歯処置が行われているが、医療上の必要性に基づき抜去された歯を試料とする研究は、今日では国内外で広く行われている。特に歯髓組織については、幹細胞を含む多種の細胞が存在することから研究材料として有用性が高い^{6,7)}。抜去歯から得られた歯髓の細胞を活用する研究は、RTT の病態を細胞レベルで解明するうえでも大きな意義があるが、現在のところ、RTT 患者の永久歯の歯髓を用いた研究は見当たらない。そこで本研究では、実験 I として、*MECP2* の 1 塩基変異により発症した RTT 女兒の永久歯から幹細胞を分離し、特性の解析を試みた。

RTT の主要な原因遺伝子が *MECP2* であることが報告された後、MeCP2 をコードする遺伝子 *Mecp2* を欠失させたモデルマウスが作られ、ヒトと同様にモデルマウスにおいても神経発達障害が引き起こされることが報告されている^{8,9)}。特に MeCP2 を完全に欠損している雄モデルマウ

スは、生後早期に RTT 患者に類似した神経症状を呈し、野生型マウスに比べて著しく寿命が短く、生後 8 ~ 12 週で死亡する^{8,9)}。MeCP2 は脳由来神経栄養因子 (BDNF) や γ -アミノ酪酸 (GABA) など様々な遺伝子の転写を調節しており、*Mecp2* の欠損によりそれらの発現が変化することから^{10,11)}、*Mecp2* が欠損した雄モデルマウス (*Mecp2*^{-y}) は RTT にみられる病態の原因を探索するうえで有用である。

Mecp2^{-y} の脳幹では、孤束核ならびに青斑核でのノルアドレナリン神経伝達の異常が報告されている^{12,13)}。しかし、MeCP2 の欠損が副交感神経を經由して内臓の運動を制御している迷走神経背側運動核 (DMV) でのアセチルコリン神経系¹⁴⁾にどのように影響を与えているのかは明らかにされていない。そこで本研究では、RTT 女兒歯髓由来細胞の解析に加え、実験 II として、8 週齢の *Mecp2*^{-y} マウスについて、DMV でのチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 免疫陽性 (IR) ニューロンおよびコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 免疫陽性 (IR) ニューロンの数と分布を調べ、野生型マウスと *Mecp2*^{-y} マウスで比較した。また DMV ニューロンでの TH と ChAT の共存の有無についても調べた。

材料および方法

1. 実験 I

1) 対象者

ヒト歯髓由来細胞を用いる実験は、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施した (倫許 EP18D011)。歯髓組織の供与について同意の得られた 10 代の RTT 女兒 1 名、および同年代の健常女兒 1 名より抜去された永久歯計 2 歯を実験に用いた。

2) 歯髓採取

対象歯を通常に従って抜去した後、根尖部を滅菌バーで 1 ~ 2 mm 削合し、根管治療用ファイルを歯髓腔に挿入して歯髓組織を採取した。滅菌シャーレ上で歯髓組織をメス

にて3mm程に細切り、組織片を培養皿に静置し培養を行った。

3) 細胞培養

RTT 女児由来歯髄組織について、20% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% penicillin streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を含む α -Minimum Essential Medium (α -MEM, 富士フィルム和光純薬, 大阪) を用いて培養を行い、37°C, 5% CO₂にてインキュベーター内で静置培養し、歯髄組織片から細胞をアウトグロースさせた。アウトグロースした細胞を Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium (タカラバイオ, 滋賀) にて培養し、実験に供した。健常女児由来歯髄組織については、RTT 女児由来歯髄組織と同様の手順で、Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium または 20% fetal bovine serum を含む α -MEM (富士フィルム和光純薬) を用いて培養を行った。

4) 歯髄細胞での未分化マーカーの発現

健常女児歯髄由来細胞 (CONT) および RTT 女児歯髄由来細胞 (RETT) から RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて全 RNA を精製し、Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ), 5×PrimeScript Buffer (タカラバイオ), PrimeScript Reverse Transcriptase (タカラバイオ), dNTP Mixture (タカラバイオ), ならびに Random Primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と反応させることにより cDNA 合成を行った。ThermalCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、表 1 に示す未分化マーカーに対するプライマーを使用して RT-PCR を行った。増幅した PCR 産物について 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、バンドを確認した。 β -actin を RT-PCR 解析の内在性コントロールとして使用した。

5) 歯髄細胞での MeCP2 ならびに幹細胞マーカーの発現

歯髄細胞での MeCP2 の発現と細胞内局在、および幹細胞マーカーの発現を調べる目的で免疫組織化学染色を行った。CONT および RETT を 8 well Lab-Tek Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 上で 1.0×10^4 個/well で播種して 24 時間培養後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、1% TritonX-100 にて透過処理を室温で 10 分間行い、1% BSA - PBS で室温にて 30 分間ブロッキングを行った。続いて、表 2 に示す一次抗体を含む溶液中で 4°C にて一晩反応させた。その後 PBS で洗浄し、蛍光標識ヤギ二次抗体 (抗マウス Alexa Fluor 488, 抗ウサギ Alexa Fluor 594) を含む溶液中で、室温、遮光下で 1 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し、DAPI を含む封入材 (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI;

表 1 RT-PCR で用いたプライマーおよび増幅産物のサイズ

Primers	Sequences	Product size (bp)
c-Myc	F 5'-TCC TGG GAA GGG AGA TCC G-3' R 5'-ACG TTG AGG GGC ATC GTC-3'	328
Sox2	F 5'-GGA AAT GGG AGG GGT GCA AA-3' R 5'-TTG CGT GAG TGT GGA TGG G-3'	150
Nanog	F 5'-TTG GAA GCT GCT GGG GAA G-3' R 5'-GAT GGG AGG AGG GGA GAG GA-3'	193
Oct4	F 5'-GGA GGG GAG GAG CTA GGG-3' R 5'-CTT CCC TCC AAC CAG TTG CC-3'	137
Klf4	F 5'-ATC GTG GCC CCG GAA AAG-3' R 5'-TGT AGT GCT TTC TGG CTG GG-3'	390
β -actin	F 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3' R 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA A-3'	186

表 2 免疫組織化学染色に用いた抗体

抗体	免疫種	メーカー名	*希釈率
MeCP2	Rabbit	Novus Biological	1:200
Ki-67	Rabbit	Abcam	1:200
SSEA3	Mouse	IBL	1:100
STRO-1	Mouse	Novus Biological	1:100
TH	Rabbit	Protos Biotech	1:100 1:1000 (DAB染色)
ChAT	Rabbit	Millipore	1:1000 (DAB染色)
ChAT	Goat	Millipore	1:100
VMAT2	Rabbit	Phoenix pharmaceuticals	1:100 1:1000 (DAB染色)
Alexa Fluor 594	Rabbit	Abcam	1:500
Alexa Fluor 488	Mouse	Abcam	1:500
Alexa Fluor 546	Goat	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 488	Rabbit	Invitrogen	1:1000

* DAB 染色以外は免疫蛍光染色での希釈率を記載

ImmunoBioScience, Mukilteo, WA, USA) にて封入した。作製した標本について、20×対物レンズと CCD カメラを備えた蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, ニコン, 東京) を使用して画像化した。

6) 免疫陽性歯髄細胞数の計測

MeCP2 と Ki-67 の陽性細胞に関しては、蛍光光源の励起強度を常に一定にして組織像をカラー画像として保存した後、陽性細胞数を計測した。画像は、CONT と RETT について、MeCP2 と Ki-67 の陽性細胞を各々 6 ウェルずつ撮影した。

2. 実験 II

1) 実験動物および飼育条件

ヘテロ接合型の *Mecp2* 欠損雌マウス (B6.129P2 (C) - *Mecp2*^{tm1.1Bird}/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)^{8, 11)} ならびに C57BL/6J 野生型雄マウス (三協ラボサービス, 東京) を購入後、本学動物実験施設にて飼育および交配を行い、生後 7 日目に *Mecp2* について遺伝子型の判定を行った。*Mecp2* 欠損がない野生型雄同腹仔

(Wt) を対照として使用した。マウスは、温度 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 5\%$) で制御された飼育室にて、12 h : 12 h の明暗サイクル (07:00 に点灯) 下で、餌と水を自由に摂取させて飼育した。動物実験は全て日本大学遺伝子組換え実験安全委員会 (2020 歯004-2) で承認され、日本大学動物実験委員会の指針にしたがって実施した (AP22DEN008-1, AP22DEN019-1)。

2) 脳切片の免疫組織化学染色

マウスを 5% イソフルラン吸入で深麻酔し、氷冷生理食塩水で経動的に灌流した後、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。直ちに脳を摘出し、 4°C で一晩固定後、30% スクロースに置換したのち -80°C で凍結保存した。続いてクライオスタット (CM1850; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて連続冠状切片 (厚さ $25 \mu\text{m}$) を作製し、浮遊法にて免疫組織化学染色を行った。切片を、表 2 に示すウサギ抗 TH ポリクローナル抗体、またはウサギ抗 ChAT ポリクローナル抗体を用いて 4°C で 24 時間反応させたのち、ヒストファインシンプルステイン MAX PO (R) (ニチレイ、東京) と室温で 60 分間反応させた。染色には Vectastain DAB Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用し、硫酸ニッケル強化ジアミノベンチジン (DAB) にて切片を処理し発色させた。Mecp2-/y マウスおよび Wt マウスは各 4 頭使用した。

3) TH-IR および ChAT-IR ニューロン数の計測

DMV での TH-IR ニューロン数ならびに ChAT-IR ニューロン数の計測には、 $20\times$ 対物レンズと CCD カメラを備えた光学顕微鏡 (ニコン) を使用し、照明強度を常に一定にして組織像をカラー画像として保存したのち、左右側の各ニューロン数を計測した。DMV の境界は、連続切片から別途作製したニッスル染色標本を用いて決定した。TH-IR および ChAT-IR ニューロン数は、吻尾側方向に $100 \mu\text{m}$ 間隔で計測した。Mecp2-/y マウスの脳の大きさが Wt マウスよりやや小さいことから¹⁵⁾、Mecp2-/y マウスと Wt マウスの脳部位の前後的位置の判定はニッスル染色標本と照合しながら行った。

4) ChAT と TH または小胞モノアミントランスポーター 2 の免疫蛍光二重染色

クライオスタットにて連続冠状切片 (厚さ $25 \mu\text{m}$) を作製し、ChAT と TH または ChAT と小胞モノアミントランスポーター 2 (VMAT2) の免疫蛍光二重染色を行った。浮遊切片を、表 2 に示すウサギ抗 TH 抗体およびヤギ抗 ChAT 抗体、またはウサギ抗 VMAT2 抗体およびヤギ抗 ChAT 抗体を含む溶液とともに 4°C で一晩反応させた。次に、切片を二次抗体とともに室温で 60 分間反応させ、スライドガラスに貼り付けた。二次抗体として Alexa Fluor

546 ロバ抗ヤギ IgG および Alexa Fluor 488 ロバ抗ウサギ IgG を使用した。封入には Fluoroshield (ImmunoBioScience) を用いた。染色した組織標本は $60\times$ 油浸対物レンズを備えたレーザー走査型共焦点顕微鏡 C1 (LSCM; ニコン、東京) で観察し、ChAT-IR ニューロンと TH-IR ニューロンあるいは VMAT2-IR 神経終末様構造の蛍光画像を取得した。

3. 統計解析

統計解析には、SPSS Statistics ver.22 (SPSS, Chicago, IL, USA) を用いた。値は平均値 \pm 標準誤差として表記した。統計的有意差は、すべての解析で $P < 0.05$ に設定した。培養歯髄細胞における免疫陽性の比率についての 2 群間の比較は Mann-Whitney *U* test を用いた。TH-IR ニューロン数ならびに ChAT-IR ニューロン数の Mecp2-/y マウスと Wt マウス間の比較には二元配置分散分析を用い、両マウス間で有意差が認められた場合には、吻尾側的に同じ位置で計測した 2 群間の数値を *t* 検定を用いて比較した。

結 果

1. 実験 I

対象の RTT 女兒の *MECP2* の変異部位は、主治医らによって c. 473C > T, p. T158M であることが確認されており、本変異は *MECP2* のメチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) 内に位置している。この MBD 内の変異により、MeCP2 のメチル化 CpG との結合が著しく低下することが明らかにされており¹⁶⁾、その下流に位置する遺伝子の発現調節に異常が生じると考えられている¹⁶⁾。本研究の実施にあたり、RETT ならびに CONT から抽出したゲノム DNA を試料として、変異部位を切断する制限酵素である Nla III を用いて RETT の変異部位を再確認したのち実験を行った。

1) 歯髄細胞における未分化マーカーの発現

RT-PCR の結果、CONT および RETT で、未分化マ-

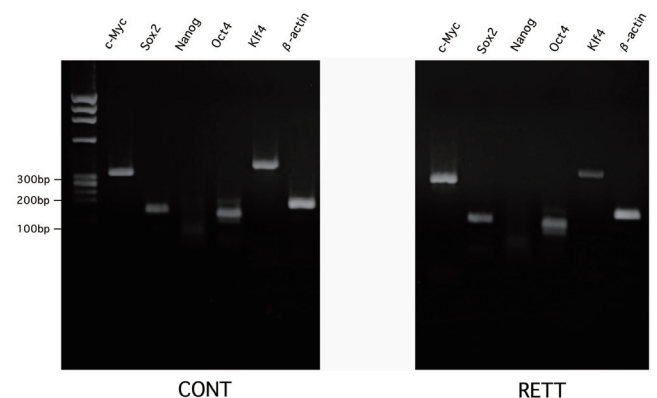


図 1 歯髄細胞における未分化マーカーの発現
CONT および RETT ともに未分化マーカー c-Myc, Sox2, Oct4, Klf4 の発現を認めたが、両細胞とも Nanog の発現はみられなかった。

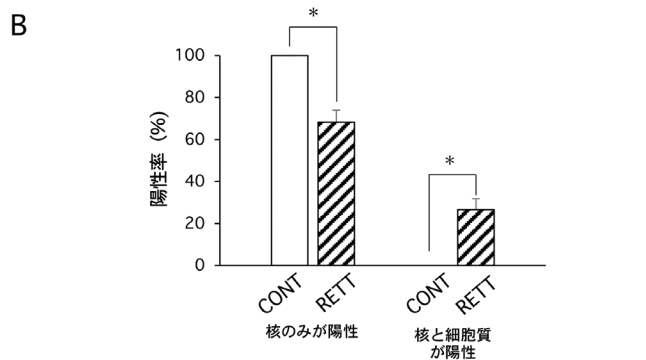
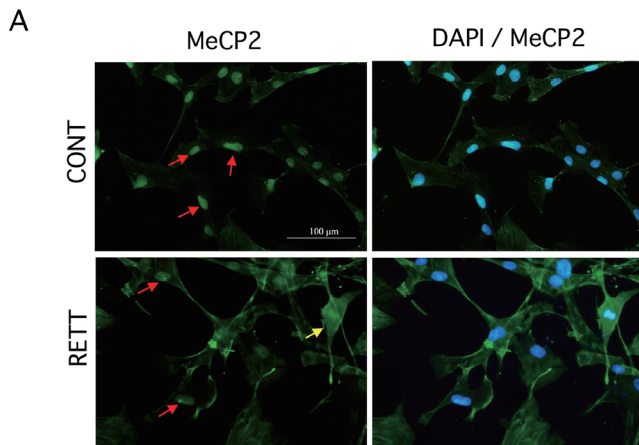


図2 MeCP2の免疫蛍光染色画像と陽性率

A: CONTでは、全細胞においてMeCP2陽性反応（緑）が主に核に局在していたのに対し、RETTではMeCP2が主に核に局在している細胞の他に、細胞質と核がほぼ同レベルで陽性反応を示した細胞が認められた。DAPIの蛍光シグナルを青で示す。赤矢印はMeCP2の核のみが陽性、黄矢印は核と細胞質が免疫陽性の細胞を示す。B: RETTでは、細胞質が核に近いレベルで免疫陽性反応を示した細胞が26.6%認められた。* $P < 0.01$

カーである c-Myc, Sox2, Oct4, Klf4 の遺伝子発現が認められたが、ともに Nanog の発現は認められなかった (図 1)。

2) 歯髄細胞における MeCP2 ならびに幹細胞マーカーの発現

CONT および RETT において MeCP2 の陽性率を調べたところ、CONT で 100%、RETT で 94.8% であった。それらのうち、CONT では全細胞で MeCP2 がほぼ核に局在していたのに対し、RETT では細胞質と核がほぼ同レベルで免疫陽性反応を示した細胞が $26.6 \pm 5.7\%$ 認められ、CONT と RETT の比較で、核のみが免疫陽性の細胞の比率、ならびに核と細胞質ともに免疫陽性の細胞の比率について有意差が認められた ($P < 0.01$) (図 2)。また増殖能のマーカーである Ki-67 についての免疫蛍光染色で、Ki-67 は核内に限局して陽性反応を示し、陽性率の平均は CONT で $93.7 \pm 1.3\%$ 、RETT では $82.3 \pm 1.3\%$ であり、CONT に

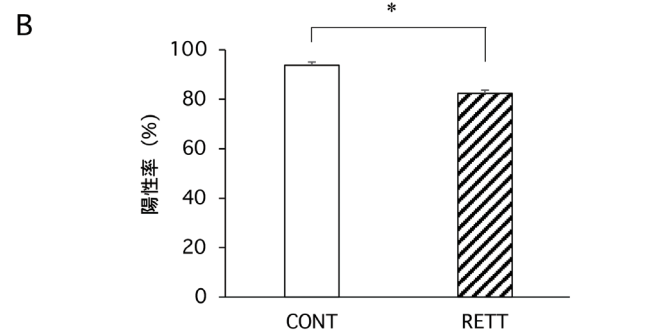
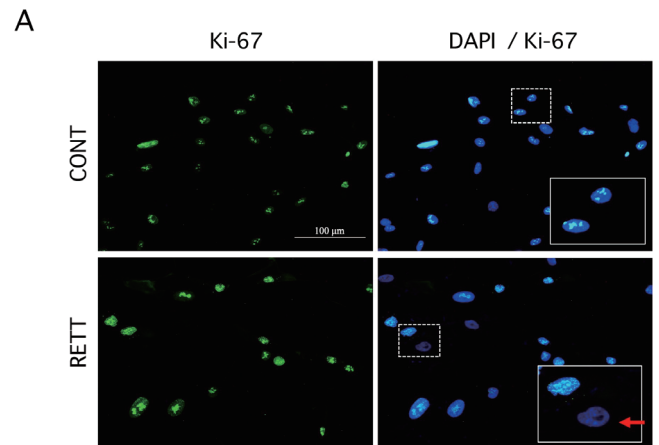


図3 Ki-67の免疫蛍光染色画像と陽性率

A: Ki-67陽性反応（緑）はCONTおよびRETTともに核内に限局していた。画像中の破線で囲む部分の拡大図を右下の四角内に示す。青はDAPIの蛍光シグナルで、赤矢印はKi-67の免疫反応が陰性の細胞を示す。B: 陽性率はCONTで93.7%であったのに対し、RETTでは82.3%と有意に低かった。* $P < 0.01$

比べ RETT で有意に低かった ($P < 0.01$) (図 3)。多能性幹細胞マーカーである SSEA3 の発現は、CONT および RETT ともに弱く、主に核周囲及び細胞表面に局在しており、両細胞で違いはみられなかった (図 4 A)。間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 は、CONT および RETT ともほとんど発現がみられず、CONT において細胞膜の一部に弱い免疫陽性反応がみられたのみであった (図 4 B)。

2. 実験 II

1) マウスの DMV における TH-IR ニューロンの発現

TH-IR ニューロンの数は Wt マウスと比較して *Mecp2*/*y* マウスの方が多く、有意差が認められた ($n = 8, P < 0.001$) (図 5)。*Mecp2*/*y* マウス、Wt マウスともに門から吻側に $100 \mu\text{m}$ の位置で最も細胞数が多かった (図 5 A)。*Mecp2*/*y* マウスにおいて、TH-IR ニューロンはおもに DMV の中央から内側に分布していた (図 5 B)。

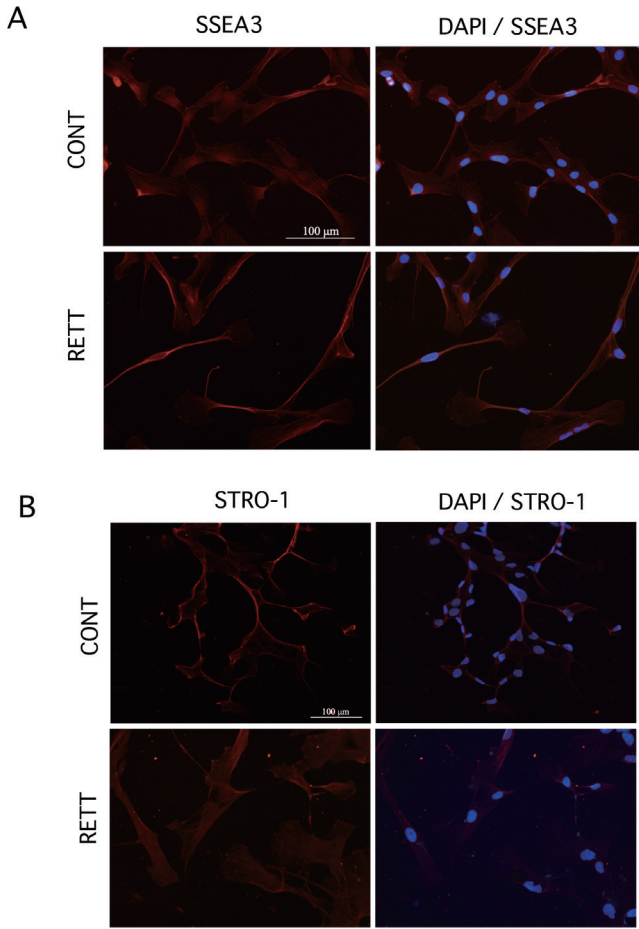


図4 SSEA3 (A) とSTRO1 (B) の免疫蛍光染色画像
SSEA3およびSTRO-1の発現は、CONTとRETTで差異はみられなかった。

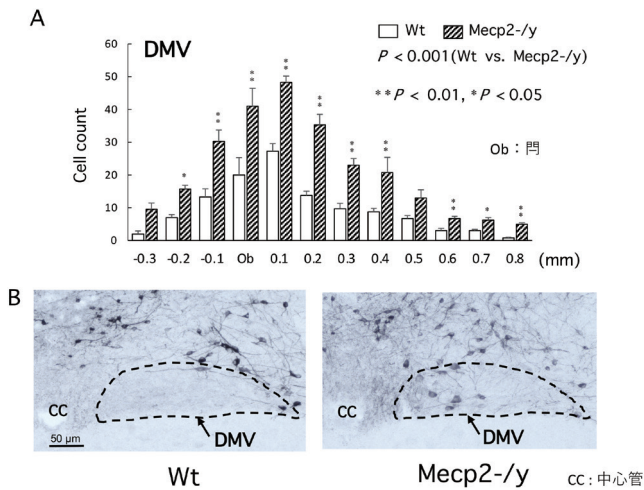


図5 DMVにおけるTH-IRニューロン
A: TH-IRニューロンの数は、WtマウスよりもMecp2-/yマウスで有意に多かった。グラフの横軸は口からの距離を示し、尾側方向はマイナス (-) で示す。B: TH-IRニューロンの局在を示す。Mecp2-/yマウスではWtマウスに比べ、TH-IRニューロンが多く認められ、それらはDMVの中央から内側に位置していた。いずれも口から吻側200 μmの画像を示す。

2) マウスのDMVにおけるChAT-IRおよびTH-IRニューロンの局在

ChAT-IRニューロンはDMV全体に分布しており、Mecp2-/yマウスとWtマウスとの比較でChAT-IRニューロンの数に違いはみられなかった(図6)。免疫蛍光二重染色を行った切片について、ChATとTHの局在をLSCMにより調べたところ、Mecp2-/yマウスのDMVにおいて二重標識されたニューロンが多く確認され、それらはDMVの中央から内側に位置していた(図7)。一方、WtマウスではChATとTHが共存するニューロンはほとんど認められなかった(図7)。

3) DMVにおけるChAT-IRニューロンおよびVMAT2-IR神経終末様構造の局在

WtマウスのDMVでは、ChAT-IRニューロンの周囲にVMAT2-IR神経終末様構造が多数存在した(図8)。一方、Mecp2-/yマウスのDMVではVMAT2-IR神経終末様構造はわずかしこ認められなかった(図8)。

考 察

CONTならびにRETTでは、いずれの細胞においても未分化マーカー遺伝子であるc-Myc, Sox2, Oct4, Klf4の発現を認めた。また、Nanogについては両細胞ともに発現が認められなかった。佐藤ら⁷⁾による報告では、永久歯歯髄由来の間葉系幹細胞では、未分化マーカーのうちc-Myc, Sox2, Oct4, Klf4が発現していたのに対し、乳歯歯髄由来の間葉系幹細胞ではc-Mycの発現が認められなかった。一方で、前者にはNanogが発現していなかった

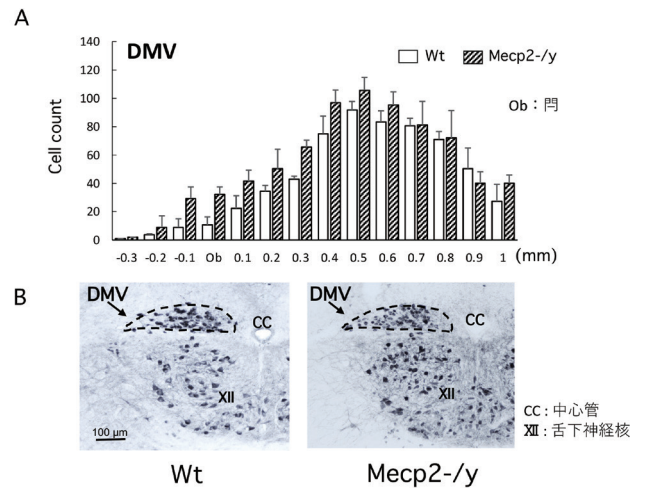


図6 DMVにおけるChAT-IRニューロン
A: Mecp2-/yマウスおよびWtマウスのChAT-IRニューロンの数に差はみられなかった。B: 口から吻側200 μmの領域でのChAT-IRニューロンを示す。DMVと同様に舌下神経核にも多くのChAT-IRニューロンを認めた。

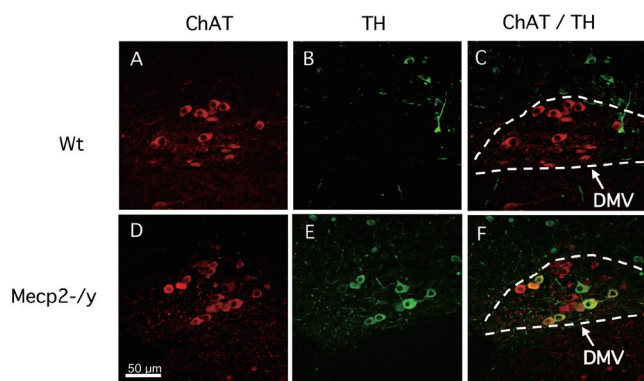


図7 DMVにおけるChAT-IRおよびTH-IRニューロンの発現
A,D: ChAT-IRニューロン。B,E: TH-IRニューロン。C: Wtマウスにおいて、ChATおよびTHの共発現はみられなかった。F: Mecp2-/yマウスにおいて、複数のニューロンでChATおよびTHの共発現を認めた。門から吻側200 μmの画像を示す。

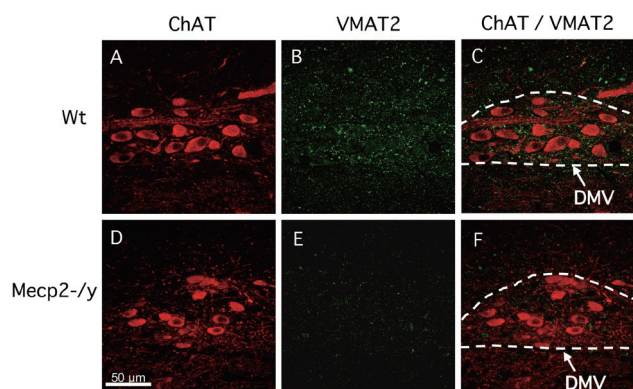


図8 DMVにおけるChAT-IRニューロンおよびVMAT2-IR神経終末様構造
A,D: ChAT-IRニューロン。B,E: VMAT2-IR神経終末様構造。C,F: WtマウスではChAT-IRニューロンの周囲にVMAT2-IR神経終末様構造が多数認められたが、Mecp2-/yマウスではわずかしき認められなかった。門から吻側200 μmの画像を示す。

のに対し、後者では発現が確認されている。本研究結果は佐藤らの結果と一致しており、RETTは健常者の永久歯髄由来の間葉系細胞と同様に、幹細胞としての性質を有していることが強く示唆された。

RETTでは一対のX染色体の片方のMECP2に変異があり、変異MECP2が活性化している細胞において転写制御機構に異常をきたしていることが考えられる。RETTに生じたMECP2の変異は1塩基置換であり、MeCP2の三次構造にはわずかな変化しか生じないことから¹⁷⁾、RETTのMeCP2はCONTのMeCP2と同様に今回使用した抗体に対する抗原性を維持していた。本研究において、CONTの全細胞でMeCP2が核に局在していたのに対し、RETTでは細胞質と核がほぼ同レベルで免疫陽性反応を示した細胞が26.6%認められ、CONTとRETTを比較した場合、核のみが免疫陽性の細胞の比率ならびに核と細胞質ともに免疫陽性の細胞の比率に有意差が認められた。今回観察さ

れた、細胞質にも明らかなMeCP2の免疫陽性反応を認めた細胞は、MECP2の変異アレルが活性化した細胞である可能性が高い。これらのRETTでは、MeCP2の核内でのDNA結合能が低下しているために核内に留まることができず細胞質に移行したものと推測される。理論的にはRETTのうちMECP2が変異した細胞の比率は50%であるが、継代培養によってその比率が変化した可能性は否定できない。Ki-67に対する免疫蛍光染色で、CONTに比べRETTでKi-67の陽性率が有意に低かったことは、RETTがCONTに比べ増殖能が低いことを示唆している。その違いが変異MeCP2の転写調節機能の低下によるKi-67発現への直接の影響なのか、それともMeCP2の変異による細胞増殖能全般への負の影響によるものなのかは今後検討する必要がある。

マウスを用いたこれまでの研究で、Mecp2-/yマウスではWtマウスに比べ、脳の複数の部位でノルアドレナリン量が低下していること¹⁸⁾、またTHを発現するA1/C1およびA2/C2細胞群のニューロン数が減少していることが報告されている¹²⁾。本研究では、Mecp2-/yマウスのDMVにおけるTH-IRニューロンならびにChAT-IRニューロンの数および分布について詳細に調べることとし、観察時に励起光源の安定性や蛍光強度変化の影響を受けやすい免疫蛍光染色ではなく、繰り返し安定した観察や計測が可能なDAB染色を採用した。Wtマウスとの比較で、Mecp2-/yマウスのDMVではTH-IRニューロンが多く認められた。また免疫蛍光二重染色でChATとの共存について検討したところ、Mecp2-/yマウスのDMVの多くのChAT-IRニューロンがTHを共発現していることを確認した。DMVでは孤束核と同様に、摂食行動後にFos免疫陽性細胞数が増加することが報告されている¹⁹⁾。これらの知見は、DMVにおいて副交感神経の制御に関与しているコリン作動性ニューロンが、Mecp2-/yマウスにおいてはTHの共発現によってカテコールアミン産生能を増強させていることを示しており、それにより胃などの消化管に分布する副交感神経の機能に変化が生じていることが示唆される。

現在のところ、Mecp2の欠損とDMVでのTH-IRニューロン数の増加あるいはコリン作動性ニューロンでのTHの共発現の増加が、Mecp2-/yマウスにおいてDMVの機能をどのように変化させるかについては不明である。これまでの研究で、延髄の神経細胞でのTHの発現に対する長期の低酸素暴露の影響が報告されている。低酸素暴露は、A2細胞群でのTH活性とmRNA発現を増加させ^{20, 21)}、孤束核とDMVでのTH量の増加を誘発した²¹⁾と報告されている。成体期のMecp2-/yマウスは呼吸中枢の機能が著しく不安定化し、無呼吸が頻発するなどの重度の呼吸異常を示す。また本研究に用いた生後8週のMecp2-/yマウスでは慢性的なチアノーゼを呈する個体が認められた。以上の報告や所見から、成体期のMecp2-/yマウスにおける持

続的な低酸素状態が、DMV ニューロンの TH 合成経路を活性化している可能性が考えられる。さらに DMV での VMAT2-IR 神経終末様構造と ChAT-IR ニューロンとの関係について免疫蛍光二重染色により観察したところ、Wt マウスでは ChAT-IR ニューロンの周囲に多数の VMAT2-IR 神経終末様構造が観察されたのに対し、Mecp2-/y マウスでは VMAT2-IR 神経終末様構造はほとんど観察されなかった。VMAT2は、主にセロトニン、ドパミン、ノルアドレナリンあるいはアドレナリンなどのモノアミン作動性ニューロンに発現することから²²⁾、Mecp2-/y マウスの DMV ではモノアミン作動性神経入力を介した機能調節に何らかの異常が生じていることが示唆される。

現在まで、MeCP2により転写が抑制または活性化されている遺伝子の探索が行われているが、実際にMeCP2の標的としてRTTの機能異常との関連が判明している遺伝子はBDNFなどに限られている¹⁰⁾。また、MeCP2の異常がどのような経路でモノアミン作動性ニューロンのシナプス形成を阻害しているのかは明らかではない。現在までRTTの病態を改善させる安全で効果的な治療法は開発されておらず、モデルマウスを用いる基礎研究は、候補となる治療用薬物を研究するうえでヒトの細胞を対象とする研究と同様に重要である。

DMVを含めて、RTT患者の脳幹におけるTHの発現やモノアミン作動性神経伝達を促進する薬物の開発、あるいは中枢神経系において変異MeCP2の機能を補完することが可能な治療法の開発は、RTT患者で観察される種々の病態の改善に役立つものと考えられた。

結 論

実験Iにて、継代培養したCONTおよびRETTについて特性を比較、解析するとともに、実験IIにて、Mecp2-/yマウスとWtマウスのDMVにおけるTH-IRおよびChAT-IRニューロンの発現を検討した結果、以下の結論を得た。

1. CONTおよびRETTでは、ともに未分化マーカー遺伝子のc-Myc, Sox2, Oct4, Klf4の発現を認めた。
2. CONTでは全細胞でMeCP2がほぼ核に局在していたのに対し、RETTでは核に加えて細胞質にも免疫陽性反応を示した細胞が26.6%認められた。またKi-67の陽性率はCONTに比べRETTで有意に低かった。
3. RETTでは変異MECP2が活性化した細胞が一定の割合で存在しており、MECP2の変異がMeCP2の細胞内局在に影響を及ぼすと同時に細胞の増殖能を低下させている可能性が示された。
4. Wtマウスとの比較で、Mecp2-/yマウスのDMVではChAT-IRニューロンの数に差はみられなかったがTH-IRニューロンの数が多く、またChATおよびTHを共発現するニューロンが多く認められた。

以上より、MECP2の変異がRETTの増殖能を低下させ

ていること、MeCP2の欠損がDMVニューロンの活動を変化させ、消化管運動を調節している副交感神経の働きに影響を及ぼしていることが示唆された。

本研究遂行にあたり、格別たるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部小児歯科学講座 白川 哲夫教授、菊入 崇准教授に謹んで深く感謝を申し上げます。また、本研究を通じ、多大なるご協力を賜りました日本大学歯学部小児歯科学講座の皆様にご感謝申し上げます。

なお、本研究では開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188.
- 2) Neul JL, Zoghbi HY (2004) Rett syndrome: a prototypical neurodevelopmental disorder. *Neuroscientist* 10, 118-128.
- 3) Neul JL (2012) The relationship of Rett syndrome and *MECP2* disorders to autism. *Dialogues Clin Neurosci* 14, 253-262.
- 4) 白川哲夫, 秋山茂久, 堤香奈子, 森崎市治郎, 田村文誉, 保母妃美子, 菊谷 武, 支 景華, 武井浩樹, 高森一乗 (2017) レット症候群患者の口腔機能障害の把握と歯科医療支援. *障害者歯*38, 140-147.
- 5) 原 宗嗣 (2015) 便秘・消化管運動異常. レット症候群診療ガイドブック. 青天日信, 伊藤雅之, 大阪大学出版会, 大阪, 183-188.
- 6) Honda MJ, Watanabe E, Mikami Y, Saito Y, Toriumi T, Shirakawa T, Shimizu N, Watanabe N, Isokawa K (2013) Mesenchymal dental stem cells for tissue regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28, 451-460.
- 7) 佐藤桃子, 石田千晶, 岩佐聡子, 武井浩樹, 本田雅規, 白川哲夫 (2014) 乳歯および永久歯歯髓組織由来間葉系細胞の特性の比較. *小児歯誌* 52, 417-424.
- 8) Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001) A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322-326.
- 9) Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001) Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-331.
- 10) Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R (2006) The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341-348.
- 11) Ishiyama M, Tamura S, Ito H, Takei H, Hoshi M, Asano M, Ito M, Shirakawa T (2019) Early postnatal treatment with valproate induces *Gad1* promoter remodeling in the brain and reduces apnea episodes in *Mecp2*-null mice. *Int J Mol Sci* 20, 5177.
- 12) Viemari JC, Roux J, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Peña F, Zanella S, Bévençut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB, Moncla A, Mancini J, Ramirez JM, Villard L, Hilaire G (2005) *Mecp2* deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci* 25, 11521-11530.
- 13) Zhang X, Su J, Rojas A, Jiang C (2010) Pontine norepinephrine defects in *Mecp2*-null mice involve deficient expression of dopamine beta-hydroxylase but not a loss of catecholaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*

- 394, 285-290.
- 14) Guo JJ, Browning KN, Rogers RC, Travagli RA (2001) Catecholaminergic neurons in rat dorsal motor nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, 361-367.
 - 15) Belichenko NP, Belichenko PV, Li HH, Mobley WC, Francke U (2008) Comparative study of brain morphology in *Mecp2* mutant mouse models of Rett syndrome. *J Comp Neurol* 508, 184-195.
 - 16) Brown K, Selfridge J, Lagger S, Connelly J, De Sousa D, Kerr A, Webb S, Guy J, Merusi C, Koerner MV, Bird A (2016) The molecular basis of variable phenotypic severity among common missense mutations causing Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 25, 558-570.
 - 17) Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Nikitina T, Gierasch LM, Woodcock CL (2008) Rett syndrome-causing mutations in human MeCP2 result in diverse structural changes that impact folding and DNA interactions. *J Biol Chem* 283, 20523-20534.
 - 18) Ide S, Itoh M, Goto Y (2005) Defect in normal developmental increase of the brain biogenic amine concentrations in the *mecp2*-null mouse. *Neurosci Lett* 386, 14-17.
 - 19) Emond MH, Weingarten HP (1995) Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding states: a quantitative study. *Physiol Behav* 58, 459-465.
 - 20) Soulier V, Dalmaz Y, Cottet-Emard JM, Kitahama K, Pequignot JM (1995) Delayed increase of tyrosine hydroxylation in the rat A2 medullary neurons upon long-term hypoxia. *Brain Res* 674, 188-195.
 - 21) Pépin JL, Lévy P, Garcin A, Feuerstein C, Savasta M (1996) Effects of long-term hypoxia on tyrosine hydroxylase protein content in catecholaminergic rat brainstem areas: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 733, 1-8.
 - 22) Eiden LE, Weihe E (2011) VMAT2: A dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1216, 86-98.